

Prof. dr hab. Łukasz Kaczmarek
Instytut Farmaceutyczny
Ul. Rydygiera 8, 01-793 Warszawa
Tel.: (22) 456 39 21; kom.: 695 755 156
l.kaczmarek@ifarm.eu

OCENA

rozprawy doktorskiej mgr Mohameda Sulimana Mahmuda p.t.

"The use of liposomal formulations of natural bioactive substances and anthracyclines in combinatory therapy of pancreatic cancer".

Nowotwory trzustki należą do grupy nowotworów o złych rokowaniach, z uwagi na brak efektywnych metod terapii. Ten znany fakt skłonił Pana mgr Mohameda Sulimana Mahmuda do rozpoczęcia prac badawczych, których celem byłoby znalezienie bardziej skutecznych sposobów zwalczających tę śmiertelną chorobę.

Badania rozpoczął Autor od rozeznania anatomii i morfologii trzustki oraz jej witalnej roli w organizmie, jako narządu wytwarzającego zarówno enzymy trawienne, jak i hormony kontrolujące poziom cukru w organizmie. Następnie Autor przeszedł do zdefiniowania i klasyfikacji nowotworów trzustki, gdzie, jak się okazuje, 95% to adenocarcinoma komórek egzokrynologicznych (PAC). Niska skuteczność terapii PAC związana jest nie tylko z wykrywaniem nowotworu w późnym stadium, gdy już nastąpiły przerzuty, ale także (a może przede wszystkim) z niską skutecznością terapii klinicznych, zarówno w postaci metod chirurgicznych, jak i chemoterapeutycznych. Skupiając się na tych ostatnich, Autor stwierdził, że większość stosowanych standardowo leków, takich jak gemcytabina, 5-FU, kapecytabina czy pochodne platynowe, przynosi marginalne korzyści terapeutyczne. Wiąże się to ze skomplikowaną strukturą nowotworu i jego biologii na poziomie molekularnym, obejmującej transkrypcję, ekspresję protein czy ścieżki sygnałowe. Przede wszystkim jednak wysoce heterogeniczny i złożony z włóknistych składników zrąb nowotworu ogranicza efektywność leków przeciwnowotworowych przez upośledzenie transportu leku do nowotworu i jego szybki metabolizm (dezaktywację). Jako metodę przezwyciężenia (lub złagodzenia) tych problemów Autor wskazał zastosowanie kombinacji istniejących leków z innymi substancjami hamującymi proliferację oraz użycie systemu docelowego transportera leku, co powinno wpłynąć dodatnio na efekt farmakologiczny. Konkretyzując tę koncepcję, Autor sformułował ogólny cel pracy, który obejmował użycie połączeń naturalnych wraz z istniejącymi cytostatykami, oraz zastosowanie liposomów, jako transporterów tych leków. Realizacja założonego celu miała prowadzić do poprawy farmakodynamiki, farmakokinetyki i biodostępności leków, zwiększenia ich stężeń w komórkach nowotworowych i synergizmu składników, a tym samym zapewnić bardziej skuteczną walkę z nowotworem. Planując użycie w badaniach związków naturalnych o właściwościach cytotoksycznych, na podstawie przeglądu literatury przedmiotu Autor wybrał trzy substancje, a mianowicie kurkuminę (CUR), kapsaicynę (CAP) i kwas alfa liponowy (ALA). Substancje te, znane od dawna w medycynie naturalnej, charakteryzują się zróżnicowanym wpływem na mechanizmy molekularne nowotworów i atakują różne drogi sygnałowe w komórce, prowadząc ostatecznie do apoptozy komórki nowotworowej (CUR i CAP). ALA pełni natomiast funkcję zmiatacza/generatora wolnych rodników. Jakkolwiek wszystkie wybrane substancje są nierozpuszczalne w wodzie, wykazują słabą biodostępność i ograniczoną trwałość w organizmach żywych, to zastosowanie liposomów powinno zlikwidować ten problem. Jako drugi składnik badanej kombinacji leków użyto znanych i stosowanych szeroko

Prof. dr hab. Łukasz Kaczmarek
Instytut Farmaceutyczny
Ul. Rydygiera 8, 01-793 Warszawa
Tel.: (22) 456 39 21; kom.: 695 755 156
l.kaczmarek@ifarm.eu

antybiotyków antracyklinowych, a mianowicie doksorubicyny (DOX), epirubicyny (EPI) i nowego antybiotyku WP 744, od niedawna wprowadzonego do kliniki w leczeniu złośliwych glejaków mózgu. Antybiotyki te, o zróżnicowanej aktywności przeciwnowotworowej, działają poprzez inhibicję topoizomerazy II, a ich główne wady to kardi toksyczność i rozwój oporności wielolekowej (MDR). Także i w tym przypadku przewidziano, że zastosowanie liposomów poprawi indeks terapeutyczny chemoterapeutyków. Przed przystąpieniem do opisu prac eksperymentalnych i ich wyniku, Autor omówił szczegółowo problem liposomów. W dysertacji przedstawiono budowę i metody otrzymywania liposomów, ich klasyfikację, stabilizującą rolę wbudowywanych cząsteczek cholesterolu oraz pasywne i aktywne metody zamykania cząsteczek leków w liposomach. W szczególności Autor skupił swą uwagę na problemie stabilności liposomów w krwiobiegu. Konwencjonalne liposomy, zbudowane z obojętnych lub naładowanych ujemnie fosfolipidów i cholesterolu są szybko usuwane przez fagocyty, podczas gdy tzw. „stealth liposomes” pokryte glikolem polietylenowym (PEG)(PEGyłowane) unikają zmasowanego ataku fagocytów, przez co ich okres trwania w krwiobiegu jest znacznie dłuższy. Ten właśnie rodzaj liposomów nadaje się szczególnie do użycia w terapii nowotworów, bowiem z uwagi na nienormalną budowę unaczynienia guza nowotworowego i przepuszczalność naczyń, długo krążące liposomy przedostają się z naczyń do tkanki nowotworowej i tam kumulują (efekt EPR) w stopniu znacznie większym, niż lek wolny. Poprawia to zdecydowanie efekt terapeutyczny i zmniejsza toksyczność ogólną chemoterapeutyku.

Kończąc rozważania teoretyczne, Autor przedstawił ostateczny, szczegółowy cel badań, obejmujący użycie liposomów jako transporterów wybranych substancji naturalnych i antybiotyków antracyklinowych, co powinno doprowadzić do poprawy efektu cytotoksycznego w stosunku do linii raka trzustki *in vitro*. Praktyczna realizacja tego celu polegała na wytworzeniu form liposomowych wybranych leków i substancji naturalnych, bazując na metodach istniejących lub nowych, optymalizacji charakterystyki fizycznej tych form, zbadaniu cytotoksyczności na komórkach raka trzustki i wyborze najlepiej działających. Zaplanowane badania miały zakończyć się studiami nad mechanizmem działania kurkuminy i określeniem efektów farmakologicznych związanych z zastosowaniem kombinacji liposomów.

W części opisującej prace eksperymentalne przedstawiono sposób otrzymania liposomów „stealth” z fosfatydylocholino pochodzącej z soi (SPC) lub jej uwodornionego analogu (HSPC) i pochodnej glikolu polietylenowego DSPE-PEG₂₀₀₀ przez liofilizację roztworów i hydratację filmu fosfolipidowego. W wytworzonych liposomach zamknięto naturalne związki CUR, CAP i ALA metodą pasywną, przy czym w niektóre liposomy wbudowano cząsteczki cholesterolu. Z kolei antybiotyki antracyklinowe DOX, EPI i WP744 zostały zamknięte w liposomach metodą aktywną, z użyciem roztworów askorbinianu, siarczanu lub wersenianu amoniowego, jako siły napędowej. Warto dodać, że liposomy zawierające WP744 zostały otrzymane po raz pierwszy. Wszystkie wytworzone liposomy zostały scharakteryzowane przez wyznaczenie wielkości i jej rozrzutu, morfologii, potencjału zeta i wydajności zamykania leków w liposomach (enkapsulacji EE). Następnie określono stabilność liposomów i ich trwałość *ex vivo* w plazmie ludzkiej. Na podstawie przeprowadzonych badań liposomów zawierających związki naturalne CUR, CAP i ALA, wyselekcjonowano formy liposomowe o najlepszych właściwościach, a mianowicie

Prof. dr hab. Łukasz Kaczmarek
Instytut Farmaceutyczny
Ul. Rydygiera 8, 01-793 Warszawa
Tel.: (22) 456 39 21; kom.: 695 755 156
l.kaczmarek@ifarm.eu

niewielkich rozmiarach, wąskim rozrzucie wielkości cząstek, prawie neutralnym potencjale zeta i wysokiej wydajności enkapsulacji. Formy te, to nie zawierające cholesterolu (który powodował gwałtowny spadek EE), PEG-ylowane liposomy zbudowane z HSPC, DSPE-PEG₂₀₀₀ i CUR, CAP albo ALA w stosunku 9.0:0.5:0.5, oznaczone jako H_{Cur5}, H_{Cap5} i H_{ALA5}. W odróżnieniu od form konwencjonalnych, nowe formy liposomowe o długim czasie trwania w układzie krwionośnym, będące przedmiotem dysertacji, wykazują właściwości fizyczne pozwalające przewidywać wysoki efekt EPR, a w konsekwencji oczekiwać wysokiej aktywności przeciwnowotworowej. Wyselekcjonowane formy liposomowe zostały poddane ocenie ich cytotoksyczności w stosunku do linii nowotworów trzustki AsPC-1 i BxPC-3. Jak stwierdzono w badaniach wstępnych, same liposomy oparte na SPC, nie zawierające leku, wykazują efekt cytotoksyczny. Spowodowało to wyeliminowanie tej klasy liposomów z dalszych prac. Przeprowadzona ocena cytotoksyczności wybranych form liposomowych wykazała zróżnicowany stopień działania przeciwnowotworowego, a mianowicie H_{Cur5} działała na obie linie nowotworowe, zaś H_{Cap5} i H_{ALA5} tylko na linię AsPC-1, przy czym formy liposomowe posiadały znacznie wyższą aktywność przeciwnowotworową, niż odpowiednie wolne substancje. Wszystkie formy liposomowe antybiotyków antracyklinowych wykazywały działanie cytotoksyczne w stosunku do obu linii nowotworowych, przy czym aktywność form EPI i WP744 przewyższała aktywność formy DOX. Co ciekawe, formy liposomowe, które wytworzono z użyciem askorbinianu amoniowego okazały się bardziej aktywne, niż wytworzone z pomocą pozostałych soli amoniowych. Efekt ten przypisano działaniu synergicznemu kwasu askorbowego.

Na zakończenie Autor wykonał prace eksperymentalne, które miały na celu podsumowanie projektu i które odpowiadały na dwa pytania, a mianowicie: w jaki sposób najciekawsza z punktu widzenia wykonanych badań forma liposomowa CUR indukuje apoptozę w komórkach nowotworowych, oraz jaki efekt przeciwnowotworowy osiąga się przez zastosowanie kombinacji liposomów zawierających antybiotyki antracyklinowe z liposomami zawierającymi związku naturalne CUR, CAP i ALA.

Badania przeprowadzone w celu rozwiązania pierwszego zadanego problem, a mianowicie indukcji apoptozy przez liposomową formę CUR wykazały, że generuje ona wewnątrzkomórkowe reaktywne formy tlenu (ROS), przy czym znacznie dłużej, niż wolna CUR. Świadczy to o większej trwałości cząsteczki zawartej w liposomie, co potwierdza założenia przyjęte na początku pracy. Druga droga, prowadząca do apoptozy komórki, to wykazana zdolność formy liposomowej CUR do aktywacji kaspazy 3/7.

Ostatnie badania, podsumowujące podstawowe założenia przyjęte w pracy, to sprawdzenie efektu zastosowania terapii przeciwnowotworowej kombinacji form liposomowych chemoterapeutyków antracyklinowych i związków naturalnych. Wystąpienie zjawiska synergii, wywołanego atakiem obu składników kombinacji na różne mechanizmy molekularne nowotworu, stanowi efekt pożądaný nie tylko z punktu widzenia efektywności terapeutycznej, ale także z uwagi na zmniejszenie toksyczności chemoterapeutyku. Uzyskane wyniki w badaniach *in vitro* na komórkach obu nowotworów trzustki wykazały istotnie efekt synergii w niektórych przypadkach (np. forma liposomowa CUR z formami liposomowymi DOX i EPI utworzonymi z użyciem askorbinianu amoniowego oraz z formą liposomową WP744 wobec obu linii nowotworowych albo forma liposomowa CAP i ALA z formą

Prof. dr hab. Łukasz Kaczmarek
Instytut Farmaceutyczny
Ul. Rydygiera 8, 01-793 Warszawa
Tel.: (22) 456 39 21; kom.: 695 755 156
l.kaczmarek@ifarm.eu

liposomową WP744 wobec linii AsPC-1.), co potwierdza oczekiwania Autora przedstawione na wstępie rozprawy.

Podsumowując, należy stwierdzić, że Autor osiągnął zaplanowane cele pracy doktorskiej. W badaniach dowiódł, że enkapsulacja potencjalnych leków w liposomach o długim okresie trwania w krwiobiegu zwiększa trwałość leków i ich właściwości przeciwnowotworowe w stosunku do linii nowotworowych trzustki. Badania te poprzedziła synteza PEGyloowanych liposomów zawierających CUR, CAP albo ALA i selekcja najlepszych z punktu widzenia stabilności, własności fizycznych i wydajności enkapsulacji. Synteza kolejnej grupy liposomów, zawierających antybiotyki antracyklinowe, pozwoliła na zbadanie efektu cytotoksycznego kombinacji liposomów zawierających naturalne substancje o właściwościach przeciwnowotworowych z liposomowymi formami tych antybiotyków. W większości przypadków osiągnięto efekt synergizmu lub addytywności, co potwierdziło założenia uzyskania korzystnego efektu farmakologicznego przez zastosowanie wymienionej kombinacji liposomów. Badanie te mogą się w przyszłości przyczynić do poprawy efektów terapii nowotworów trzustki.

Praca zawiera wyczerpujące uzasadnienie podjętych badań i staranną analizę literaturową, obejmującą zarówno dotychczasowy stan terapii nowotworów trzustki jak i charakterystykę tych nowotworów i mechanizmów molekularnych ich funkcjonowania. Analizując przyczyny niepowodzenia terapii nowotworów trzustki, Autor stawia hipotezę użycia kombinacji form liposomowych leków i substancji naturalnych o właściwościach przeciwnowotworowych i przedstawia przegląd literaturowy dotyczący otrzymywania, budowy i klasyfikacji liposomów oraz ich zastosowania, jak również substancji naturalnych i chemoterapeutyków nadających się do wykorzystania w zaplanowanych badaniach.

Zarówno cel pracy, jak i plan działania są jasne i logiczne. Opis prac jest przejrzysty i konsekwentny. Praca doktorska jest napisana starannie, choć Autor nie uniknął błędów w Tabelach 4 i 5 (str. 50 i 51), gdzie zawartość cholesterolu w kompozycjach liposomów nie zawsze koreluje z odpowiednim typem liposomu.

Na zakończenie należy podkreślić, że wyniki badań będących przedmiotem recenzowanej dysertacji zostały opublikowane w postaci jednej publikacji w *PLOS ONE* (Open Access Journal), i przedstawione na sześciu krajowych i międzynarodowych konferencjach.

Całość recenzowanej pracy świadczy o odpowiednim przygotowaniu Doktoranta do prowadzenia badań naukowych i spełnia wymagania ustawy o stopniach i tytułach naukowych. Na tej podstawie wnioskuję o dopuszczenie Pana mgr Mohameda Sulimana Mahmuda do dalszych etapów przewodu doktorskiego w sprawie nadania stopnia naukowego doktora nauk biologicznych w dyscyplinie biotechnologia.

Warszawa, 7.06.2017

INSTYTUT FARMACEUTYCZNY



Prof. dr hab. Łukasz Kaczmarek